

BA



⑪ N.º de publicación: ES 2 023 556
 ⑫ Número de solicitud: 9001680
 ⑬ Int. Cl.³: C07H 3/06
 C12Q 1/34

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

⑭ Fecha de presentación: 18.06.90

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: 16.01.92

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente: 16.01.92

⑰ Titular/es: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 Serrano, 117
 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: Aragón, Juan J.; Corrales, Guillermo; Fernández Mayoriales, A. Jiménez Barbero, J.; Martín Lomas, M.; Rivera Sagredo, Alfonso y Villanueva, Daniel

⑲ Agente: No consta

⑳ Título: Procedimiento de obtención de 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa utilizable para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

㉑ Resumen:
 El procedimiento de obtención de 4 - O - β - D - galactopiranosil - D - xilosa utilizable para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal en una primera etapa tiene lugar una acetilación de bencil β-xilósido para dar el correspondiente 2, 3 - diacetil, en una segunda etapa se somete a una reacción de β - galactosidación para dar un disacárido protegido que, en posteriores etapas se desbloquea por desacetilación ácida suave, desacetilación catalítica y desbencilación.
 Este procedimiento es aplicable para la valoración de la actividad lactasa intestinal *in vivo*, sin necesidad de utilizar procedimiento cromatográfico alguno.

BEST AVAILABLE COPY

DESCRIPCION

Las disacaridas intestinales de los animales superiores están localizadas en la membrana luminal del intestino delgado, donde hidrolizan los disacáridos de la dieta como paso previo a la absorción de monosacaridos. Una de estas disacaridasas intestinales es la lactasa, que hidroliza el azúcar de la leche, el disacárido lactosa, formando glucosa y galactosa que son como tales absorbidos y metabolizados.

La deficiencia, o más propiamente, baja actividad en lactasa intestinal es rara como error metabólico congénito, pero es un síndrome normal en ratas y conejos adultos, y muy común en humanos adultos. En la mayor parte de los mamíferos existe una acusada disminución de la actividad lactasa desde el momento del destete, excepto en los humanos cuyos antepasados hayan dependido de un consumo sustancial de leche o de productos lácteos durante largo tiempo.

La determinación de la actividad lactasa intestinal es de importancia en pediatría y gastroenterología y puede llevarse a cabo directamente, a partir de una muestra de mucosa, o indirectamente a partir del nivel de glucosa en sangre o del hidrógeno expirado después de la administración al paciente de una dosis de lactosa.

En patentes anteriores hemos descrito procedimientos de obtención de 3 - 0 - metil lactosa y su utilización en la evaluación *in vivo*, de modo rutinario, incruento y específico de la actividad lactasa intestinal. El método de evaluación se basa en que la 3 - 0 - metil lactosa se comporta como sustrato de la enzima transformándose, por acción de ésta, en 3 - 0 - metil - D - glucosa y D - galactosa. La 3 - 0 - metil - D - glucosa es absorbida fácilmente por el intestino y eliminada rápidamente en la orina debido a una favorable combinación de especificidades, ya que es un buen sustrato del transportador de glucosa intestinal, es prácticamente inerte a la hexoquinasa y a la glucoquinasa y no es sustrato del transportador de glucosa renal. Por tanto, la administración oral de 3 - 0 - metil lactosa conduce a la eliminación en orina de 3 - 0 - metil - D - glucosa que puede analizarse por un procedimiento cromatográfico.

Este método, siendo incruento y específico, presenta un inconveniente que deriva de la necesidad de utilizar un procedimiento cromatográfico para la detección de 3 - 0 - metil - D - glucosa en orina, lo que circunscribe su utilización a hospitales que tengan tal equipamiento analítico. En esta patente se describe un procedimiento de obtención de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa, disacárido que se comporta también como sustrato de la lactasa intestinal dando lugar a galactosa y xilosa. La xilosa se absorbe también fácilmente por el intestino y se elimina en la orina, donde pueden evaluarse directamente por un sencillo método colorimétrico obviando el uso de cromatógrafo de gases o de líquidos.

La preparación del disacárido 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilona se ha llevado a cabo a partir de bencil β - D - xilopiranosido por acetalación en presencia de un catalizador ácido, para dar el bencil 2,3 - 0 - isopropiliden - β - D - xilopiranosido, que se condensó con un haluro de per - 0 - acil - α - D - galactopiranosilo en presencia de una sal de plata o mercurio. El disacárido protegido formado se desbloqueó utilizando primero una hidrólisis ácida suave, luego una desacilación catalítica y, finalmente, una hidrogenólisis catalítica para dar el disacárido deseado.

Como fuente de lactasa intestinal, libre de β - galactosidasa lisosomal, se ha aislado "brush border" de la mucosa intestinal de cordero y la enzima se ha purificado por el método de Skojber et al. Esta lactasa intestinal hidrolizó el disacárido sintético a pH 6.0 : $V_{max} = 20\%$, $K_M = 38$ mM frente a $K_M = 11$ mM para lactosa.

La 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa se administró a ratas lactantes por vía oral recogiendo seguidamente su orina y analizando, cromatográfica y colorimétricamente, azúcares en ella. Los resultados indican que la xilona aparece en la orina al poco tiempo de ser administrado el disacárido. Cuando el disacárido se administró a ratas adultas, con escasa actividad lactosa, se detectó en la orina una cantidad bastante inferior de xilosa. El método, tanto en ratas lactantes como en adultas, se ha comparado con el anterior que utiliza 3 - 0 - metil lactosa.

En lo anteriormente descrito, se ha nentado las bases para la valoración de la actividad lactasa intestinal *in vivo*, sin necesidad de utilizar procedimiento cromatográfico alguno, consistente en la administración oral de 4 - 0 - β - D - galacto - piranosil - D - xilosa y análisis colorimétricos de xilosa en orina. La 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa es un aceptable sustrato de la lactasa intestinal y, administrada por vía oral a ratas, conduce a la aparición de xilosa en orina valorable colorimétricamente. Con base en estos resultados, se propone la utilización de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilona para la evaluación incruenta, sencilla y específica de las deficiencias de lactasa.

Ejemplo:

Preparación de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa

Una solución de bencil β - D - xilopiranosido (3.36 g, 14 nmoles) en dimetilformamida seca (50 ml), se trató con ácido p - toluensulfónico (136 mg) y 2,2 - dimetoxipropano (17.5 ml) durante 2 h a 70°C. Al cabo de este tiempo se añadió trietilamina y se evaporó en vacío. El residuo se introdujo en una columna de gel de sílice eluyendo con una mezcla de acetato de etilo - hexano 1:2 v/v. Se eluye primero el 3,4 - diacetato (35 mg, 6.2%) y seguidamente el deseado 2,3 - diacetato (184 mg, 33%), $[\alpha]_D - 46.9^\circ$ (c 1.09, cloroformo).

El producto anterior (1.33 g) se disolvió en nitrometano (27 ml) y a la disolución se añadió triflato de plata (1.56 g) y 2,4,6 - colidina (0.71 ml) y se enfrió a - 25°C, añadiendo a continuación, gota a gota, una solución de bromuro de 2,3,4,6 - tetra - 0 - benzoil - α - D - galactopiranosilo (3.45 g) en nitrometano durante 0.5 h. Diez minutos después de terminada la adición, se añadió piridina (2.7 ml), se diluyó con eter, se filtró y el filtrado se lavó con tiosulfato sódico, con agua, con ácido sulfúrico 2M, y con solución saturada de bicarbonato sódico, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en metanol (40 ml), se añadió ácido p - toluensulfónico (190 mg) y se dejó estar durante quince minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo la solución se neutralizó con trietilamina (4 ml) y se concentró a sequedad. El residuo se cromatografió sobre una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de hexano:acetato de etilo 2:1 \rightarrow 2:3 \rightarrow 1:1 v/v. Se obtuvieron 1.73 g de un sólido amarillo. Este sólido (1.63 g) se disolvió en una solución 0.1 M de metóxido sódico en metanol (4 ml) a temperatura ambiente, se dejó estar durante 15 minutos y a continuación se trató con resina Amberlita IR - 120 - (H⁺) hasta neutralidad, se filtró y se concentró a sequedad para dar un residuo que se disolvió en una mezcla de etanol:metanol:agua 50:80:12 v/v, y se trató con hidrógeno en presencia de catalizador de paladio sobre carbón activo (160 mg) durante 20 horas. La suspensión se filtró sobre celita y el filtrado se concentró a sequedad para dar un residuo que se purificó sobre una columna de gel de sílice aluyendo en gradiente con la mezcla metanol:cloroformo:ácido acético 1:2:2 \rightarrow 6:5:0.05 v/v. La 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa (590 mg) se obtuvo prácticamente pura de esta columna. P.f. 160 - 168°C $[\alpha]_D + 22^\circ \rightarrow +15.2^\circ$ (c 1.05, agua).

¹H - r.m.n. (300 MHz, D₂O): δ 5.17 (d, 1H, J_{1,2} 3.8 Hz, H - 1 α), 4.58 (d, 1H, J_{1,2} 7.9 Hz H - 1 β), 4.55 (d, 1H, J_{1',2'} 7.8 Hz, H - 1'), 4.45 (d, 1H, J_{1,2} 7.8 Hz, H - 1').

Análisis. Calculado para C₁₁H₂₀O₁₀: C, 42.31; H, 6.46; Encontrado: C, 42.16; H, 6.60.

Eliminación de xilona en orina tras administración oral de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa:

Un grupo de tres ratas lactantes, de la misma camada y con quince días de edad (A₁, A₂ y A₃) se mantuvo en ayuno durante cuatro horas en cajas metabólicas a 30°C. A cada una de estas ratas se le administró 18.2 g de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa en 0.5 ml de agua destilada. Otro grupo de ratas de la misma camada (B₁, B₂ y B₃) se trató del mismo modo, pero administrando a cada una 18.2 mg de 3 - 0 - metil lactosa en 0.5 ml de agua de agua a efectos de comparación. Se recogió orina, presionando la vejiga transabdominalmente, durante cinco horas. Los azúcares eliminados en orina durante este tiempo se analizaron cromatográficamente y espectroscópicamente en el primer caso (ratas A₁, A₂ y A₃) y cromatográficamente en el segundo.

El experimento se repitió administrando 18.2 mg de 3 - 0 - metil lactosa en 0.5 ml de agua a cada una de las tres primeras ratas (A₁, A₂ y A₃) y 18.2 mg de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa en 0.5 ml de agua a cada una de las tres restantes (B₁, B₂ y B₃).

En un experimento control, cada una de las ratas A₁, A₂ y A₃ recibió oralmente 9 mg de xilosa en 0.5 ml de agua, y cada una de las ratas restantes (B₁, B₂ y B₃) recibió, igualmente 9 mg de 3 - 0 - metil - D - glucosa en 0.5 ml de agua. Las orinas de cinco horas se analizaron del mismo modo. Los resultados de estas experiencias están recopilados en la Tabla 1.

La experiencia se repitió con las mismas ratas, ya adultas, dos meses más tarde. En este caso, cada una de las tres primeras (A₁, A₂ y A₃) recibió oralmente 36.4 mg de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa en 0.5 ml de agua, y cada una de las tres restantes (B₁, B₂ y B₃) 36,4 mg de 3 - 0 - metil lactosa en 0.5 ml de agua. En ambos casos se recogió orina durante 20 horas. En el experimento cruzado cada una de las tres primeras ratas (A₁, A₂ y A₃) recibió 18.2 mg de 3 - 0 - metil lactosa en 0.5 ml de agua, y cada una de las tres restantes (B₁, B₂ y B₃) 18.2 mg de 4 - 0 - metil - β - D - galactopiranosil - D - xilosa, y se actuó de la misma manera. En el experimento control, cada una de cuatro ratas diferentes

2 023 556

de la misma edad (C_1 , C_2 y C_3) recibió 18 mg de xilosa en 0.5 ml de agua, y cada una de las mismas ratas (C_1 , C_2 y C_3) recibió, 24 horas después, 19 mg de 3 - 0 - metil - D - glucosa en 0.5 ml de agua, y, en ambos casos, se recogió la orina durante 10 horas. Los resultados de estas experiencias se encuentran recopilados en la Tabla 2.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Tabla 2: Eliminación de D-xilosa y 3-O-metil-D-glucosa en orina de ratas adultas

Ratos	Azúcares administrados por vía oral (mg)				Azúcares eliminados en orina durante cinco horas			
	Xil	3MeGlc	Gal-Xil	3MeLac	Determinación espectrofotométrica (%)		Determinación cromatográfica (%)	
					Xil	Xil (de Gal-Xil)	Xil (de Gal-Xil)	3MeGlc (de 3MeLac)
A1			36.4	18.2		7.4	2.8	4.3
A2			36.4	18.2		11.4	3.6	2.7
A3			36.4	18.2		4.7	6.0	1.8
B1			18.2	36.4		8.0	8.0	0.6
B2			18.2	36.4		6.8	7.5	3.0
B3			18.2	36.4		4.6	3.8	2.5
C1	18.0	18.0			55.0		35.0	83.0
C2	18.0	18.0			44.0		31.0	100.0
C3	18.0	18.0			33.0		22.0	86.0
C4	18.0	18.0			10.0		36.0	83.0

Xil = D-xilosa; 3MeGlc = 3-O-metil-D-glucosa; Gal-Xil = 4-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa; 3MeLac = 3-O-metil lactosa

Tabla 11. Eliminación de D-Xilosa y 3-O-metil-D-glucosa en orina de ratas lactantes

Azúcares administrados por vía oral (mg)				Azúcares eliminados en orina durante cinco horas						
Ratas	Xil	3MeGlc	Gal-Xil	3MeLac	Determinación espectrofotométrica (%)			Determinación cromatográfica (%)		
					Xil	Xil (de Gal-Xil)	Xil	Xil (de Gal-Xil)	3MeGlc	3MeGlc (de 3MeLac)
A1	9.0		18.2	18.2	38	18	31	14		17
A2	9.0		10.2	10.2	45	24	35	14		21
A3	9.0		18.2	10.2	36	22	27	12		19
B1		9.0	10.2	18.2		18		10	98	18
B2		9.0	18.2	18.2		20		9	95	17
B3		9.0	18.2	18.2		22		9	92	22

Xil = D-Xilosa; 3MeGlc = 3-O-metil-D-glucosa; Gal-Xil = 4-O-β-D-galactopiranosil-O-xilosa; 3MeLac = 3-O-metil lactosa

REIVINDICACIONES

1. "Procedimiento de obtención de 4 - 0 - β - D - galactopiranosil - D - xilosa utilizable para la evaluación diagnóstica de la actividad lactasa intestinal" caracterizado porque en una primera etapa
5 tiene lugar una acetalación del bencil β - xilosido para dar el correspondiente 2,3 - diacetal, que en una segunda etapa se somete a una reacción de β - galactosidación para dar un disacárido protegido que, en tercera, cuarta y quinta etapas se desbloquea por desacetilación ácida suave, desacilación catalítica y desbencilación.
- 10 2. Un procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque en la primera etapa se emplea como agente acetalante 2,2 - dimetoxipropano, 2 - metoxipropeno, 1 - etoxiciclohexeno o 1,1 - dimetoxi-
ciclohexano en presencia de ácido p - toluensulfónico o de p - toluensulfonato de piridinio.
- 15 3. Un procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque en la β - galactosilación de la segunda etapa se emplea bromuro de 2,3,4,6 - tetra - 0 - acetil - α - D - galactopiranosilo en presencia de
triflato de plata, cianuro mercurico o bromuro mercurico.
- 20 4. Procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque en la tercera etapa la desacetilación se realiza con ácido p - toluensulfónico.
5. Un procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque la desacilación de la cuarta
etapa se realiza con metóxido sódico en metanol.
- 25 6. Un procedimiento según reivindicación 1 y caracterizado porque en la quinta etapa, la desbenci-
lación se realiza por hidrogenolisis en presencia de un catalizador de paladio.

30

35

40

45

50

55

60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)